

OXIDATION VON CYTOCHROM b_5 DURCH
HYDROPEROXYDE IN DER
LEBER DER RATTE

Max Großkopf

1977



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555615_0102

Aus dem Institut für Physiologische Chemie
Physikalische Biochemie und Zellbiologie
der Universität München

Vorstände: Prof. Dr. Dr. h.c. Th. Bücher
Prof. Dr. E.M. Klingenberg - Prof. Dr. F. Miller
Prof. Dr. H.G. Zachau

OXIDATION VON CYTOCHROM b_5 DURCH HYDROPEROXYDE
IN DER LEBER DER RATTE



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Max Großkopf

aus München

1977

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der
Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. H. Sies
Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. h.c. Th. Bücher
Dekan: Prof. Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung: 26.04.77



On ne dit pas de choses solides, lorsqu'on
cherche à en dire d'extraordinaires...

L'obscurité est le royaume de l'erreur.

Vauvenargues, Réflexions et Maximes.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. <u>Einleitung</u>	1
2. <u>Methodik</u>	3
2.1 Isolierung von Hepatozyten	3
2.2 Präparation von Mitochondrien und Mikrosomen	4
2.3 Hämoglobinfreie Leberperfusion	4
2.4 Experimente mit Hepatozyten	5
2.5 Photometrietechnik	6
2.6 Chemikalien	8
3. <u>Ergebnisse</u>	9
3.1 Oxidation von Cytochrom b_5 durch Hydroperoxyde in isolierten Hepatozyten	9
3.2 Oxidation von Cytochrom b_5 in perfundierter Rattenleber	15
3.3 Oxidation von Cytochrom b_5 durch Hydroperoxyde und ihre Beziehung zur Atmungskette der Mitochondrien	18
3.4 Cytochrom P-450 und der Effekt von Hydroperoxyden auf Cytochrom b_5	20
3.5 Oxidation von Cytochrom b_5 in isolierten Mikrosomen	24
4. <u>Diskussion</u>	25
4.1 Identifizierung der durch Hydroperoxyde hervorgerufenen Spektraländerungen als Oxidation von Cytochrom b_5	25

	Seite
4.2 Cytochrom b_5 und Cytochrom P-450	26
5. <u>Zusammenfassung</u>	28
6. <u>Literatur</u>	31

1. Einleitung

Cytochrom b_5 ist ein Hämoprotein, das 1952 von Strittmatter und Ball (1) entdeckt wurde. Die Informationen über die funktionellen Eigenschaften dieses Cytochroms in situ sind bis heute unvollständig. Cytochrom b_5 ist ein Baustein der Membranen des endoplasmatischen Retikulums und der Mitochondrienaußenmembranen. Der Gehalt der Rattenlebermikrosomen an Cytochrom b_5 beträgt 1.0 - 1.1 nMol/mg Protein (2,3), während in der Außenmembran von Rattenlebermitochondrien nur 0.16 nMol/mg Protein gefunden wurden (4).

In den letzten Jahren wurden beim Studium des isolierten Cytochroms b_5 große Fortschritte erzielt, es gelang zum Beispiel die Proteinstruktur aufzuklären (2,5,6), es wurden Studien über die Verteilung des Cytochroms b_5 sowie über dessen Beweglichkeit in den Membranen (2,7) durchgeführt, es konnten Akzeptorsysteme für das Cytochrom b_5 gefunden werden wie die Stearyl-CoA-Desaturase (8,9), es fand sich eine durch Ascorbinsäure katalysierte Reaktion mit einer zu den Flavoproteiden gehörenden Cytochrom b_5 - Reduktase (10).

Frühere Versuche zeigen, daß Cytochrom b_5 in der hämoglobinfrei perfundierten Rattenleber im normoxischen Zustand reduziert vorliegt (11,12). Genauere Informationen über Faktoren, die den Redoxzustand des Cytochroms in der Zelle zu beeinflussen vermögen, könnten für die weitere

Aufklärung der Rolle des Cytochroms b_5 im Metabolismus der Leberzelle nützlich sein.

Von verschiedenen Untersuchern wurde daher versucht, auf den Redoxzustand von Cytochrom b_5 in situ Einfluß zu nehmen. Lübberts und Mitarbeiter versuchten zum Beispiel Cytochrom b_5 in perfundierter Rattenleber mit Ferricyanid zu oxidieren (11b). Dabei gelang eine Änderung des Redoxzustandes von Cytochrom b_5 , die jedoch wenig Auswirkung auf die weitere Erforschung des Cytochroms b_5 hatte. Cinti und Schenkman gelang es nicht, mit Ferricyanid den Redoxzustand von Cytochrom b_5 in Leberschnitten zu verändern (13).

In dieser Arbeit sollen Möglichkeiten gezeigt werden, Cytochrom b_5 in situ in verschiedenen Systemen (in hämoglobinfrei perfundierter Rattenleber, in isolierten Hepatozyten und in Mikrosomen aus Rattenleber) zu oxidieren, um auf diese Weise an der intakten Zelle den Redoxzustand dieses Cytochroms b_5 bei verschiedenen Stoffwechselzuständen untersuchen zu können. Organische Hydroperoxyde haben sich dabei als besonders geeignet erwiesen (13a).

2. Methodik

2.1 Isolierung von Hepatozyten

Die zu den Experimenten benötigten Hepatozyten wurden mit Hilfe einer von Berry und Friend (14) initiierten Methode gewonnen. Männlichen Wistar-Ratten mit einem Körpergewicht von 150 - 210 g wurde die Leber entnommen und über die vena portae und vena cava perfundiert. Die Tiere waren mit einem standardisierten Kleintierfutter gefüttert (Altromin) und erhielten Wasser ad libitum. Das zur Perfusion verwendete Medium enthielt 115 mM NaCl, 5.9 mM KCl, 1.2 mM $MgCl_2$, 1.2 mM NaH_2PO_4 , 1.2 mM Na_2SO_4 , 25 mM $NaHCO_3$, 10 mM D-Glukose. Es wurde auf 37° C thermostatisiert und mit Carbogen äquilibriert um einen pH von 7.4 zu erreichen. Der Durchfluß lag bei 3.5 - 4.0 ml/min/g Leber. Das aus der vena cava ausströmende Perfusat wurde während der ersten 15 min verworfen, dann wurde das System bei einem Gesamtvolumen von 100 ml geschlossen und 40 mg Kollagenase (Aktivität etwa 0.15 U/mg) zugegeben (Kollagenase aus Clostridien, von Boehringer Mannheim). Nach weiteren 20 min Perfusion wurde die Leber in eine flache Porzellanschale mit 50 ml des oben beschriebenen Perfusats, das ebenfalls mit Carbogen bei 37° C äquilibriert war, übergeführt und die Leberkapsel durch Einschnitte mit einem Plastikspatel eröffnet, um die Leberzellen freizusetzen. Die

Zellen wurden in Zentrifugenröhrchen aufgenommen und nach der Sedimentation mit dem oben beschriebenen Medium gewaschen, bevor sie durch ein Gaze-Filter gefiltert wurden. Nach dieser Prozedur wurden die Zellen noch zweimal mit einem Medium wie oben beschrieben, das aber zusätzlich 2.5 mM CaCl_2 enthielt, gewaschen. Das auf diese Weise erhaltene Sediment wird hier Hepatozyten genannt; es ist nicht ausgeschlossen, daß geringe Mengen von Kupfferschen Zellen ebenfalls darin enthalten sind. Die Trypanblaufärbung zeigte mehr als 95% lebende Zellen; ein biosynthetischer Prozeß, die Bildung von Harnstoff aus Ammoniumchlorid, lief mehr als 15 min linear während der Dauer der Experimente bei einer Bildungsrate von $1.4 \mu\text{Mol/min/g}$ Feuchtgewicht der Leberzellen (15, 16).

2.2 Präparation von Mitochondrien und Mikrosomen

Die Mitochondrien wurden nach der Methode von Estabrook und Holowinsky (17) präpariert.

Die Mikrosomen Wurden durch Zentrifugieren des 8700 x g Überstandes für 60 min bei 105000 x g erhalten.

2.3 Hämoglobinfreie Leberperfusion

Die Leber von 140 - 170 g schweren männlichen Wistar-Ratten wurde via vena portae - vena cava mit einem für 33°C an der Leberoberfläche thermostatisierten und über einen

Schlauchoxygenator mit Carbogen äquilibrierten Medium durchströmt. Der Durchfluß betrug 3.0 - 3.5 ml/min/g Leber. Das Perfusat wurde nicht rezirkuliert (offenes System), es enthielt 115 mM NaCl, 5.9 mM KCl, 1.2 mM MgCl₂, 1.2 mM NaH₂PO₄, 1.2 mM Na₂SO₄, 2.5 mM CaCl₂, 25 mM NaHCO₃. Ausserdem wurden je 0.2 mM Laktat und Pyruvat zugesetzt. Über Präzisionsmikropumpen konnten Lösungen in abgestuften Mengen kontinuierlich zum Perfusat zugesetzt werden (16).

2.4 Experimente mit Hepatozyten

Von der Zellsuspension wurde eine Probe in eine mit einem bei 37° C gehaltenen Inkubationspuffer gefüllte 1-cm-Glasküvette übertragen. Die Küvette wurde in einen thermostatisierten Küvettenhalter gestellt und die Zellsuspension entweder magnetisch oder mit einem kleinen motorgetriebenen Mischer gerührt.

Es wurden zwei verschiedene Versuchsbedingungen angewendet:

Inkubationsbedingung I

Das Inkubationsmedium bestand aus 10 mM MOPS - Puffer (Morpholinopropansulfonsäure), pH auf 7.4 eingestellt, 154 mM NaCl, 6.2 mM KCl. Die Lösung war luftgesättigt; das Gesamtvolumen in der Küvette betrug 1 ml, es wurden 4 - 8 mg Hepatozytenprotein zugegeben, das System war geschlossen. Die Sauerstoffkonzentration wurde mit einer Sauerstoffelektrode vom Clark - Typ überwacht.

Inkubationsbedingung II

Zu einer mit dem in 2.3 beschriebenen Perfusionsmedium (16) gefüllten Küvette (Ca^{++} -Ionen vorhanden, aber keine Glukose zugesetzt) wurden etwa 8 -12 mg Hepatozytenprotein zugegeben. Die Suspension war bei einem pH von 7.4 mit Carbogen äquilibriert, das System für den Gasaustausch offen, das Gesamtvolumen betrug 1.5 ml.

Die später beschriebenen Effekte traten ohne Unterschied für beide Arten der Inkubation auf. Am Ende eines jeden Experiments wurden Proben für die Bestimmung des Proteingehalts (nach der Biuret-Methode mit Albumin als Standard) genommen. In Stichproben wurde auch die LDH - Aktivität im Zellüberstand gemessen, sie lag unter 20% der Gesamtaktivität.

Die Zugabe von Kohlenmonoxyd geschah durch Einblasen mit einer feinen Kanüle in Mengen, die ausreichten die 450 nm - Bande des Cytochroms P 450 zu zeigen ohne eine Anoxie zu verursachen (Abb.9).

2.5 Photometrietechnik

Die Extinktionsdifferenzspektren wurden auf einem Rapid-spektroskop (Kieler Howaldtswerke) gemessen (18,19). Es wurden 20 Spektren/sec von den in einer thermostatisierten Küvette inkubierten Hepatozyten gemessen.

Diese Spektren wurden in einem Fabritek-Rechner Mod. 1072 gespeichert und nach digitaler Subtraktion von Kontrollspektren als Differenzspektren auf einem XY - Schreiber registriert (20).

In den vorliegenden Versuchen wurden für jede Versuchsbedingung 64 Spektren aufgenommen und gemittelt. Ausserdem wurden zur Überprüfung, ob die Resultate stationäre Zustände repräsentieren, jeweils noch fortlaufend weitere Spektren aufgezeichnet.

Die Zweiwellenlängen-Messungen wurden auf einem Spezialphotometer durchgeführt, das von Dr. H. Schwab und Mitarbeitern (Elektronikabteilung des SFB Med. Molekularbiologie und Biochemie München) konstruiert und gebaut wurde.

Bei diesem Photometer wird das Licht einer 150 W Xenonlampe mittels eines optischen Gitters spektral aufgespalten. Aus diesem Spektrum wird Licht zweier wählbarer Wellenlängen mit Hilfe einer mit 120 Hz rotierenden Scheibe abwechselnd durch Lichtleiter an das Meßobjekt herangebracht. Nach Passage des Meßobjekts wird das Restlicht durch einen weiteren Lichtleiter einem EM 9601 B Photomultiplier über ein 2 mm dickes UG 2 Filter zugeführt (16).

2.6 Chemikalien

Das tert-Butyl-Hydroperoxyd und das Cumolhydroperoxyd wurden von der Firma Peroxid Chemie München GmbH (Höllriegelskreuth) zur Verfügung gestellt. Die Präparationen enthielten etwa 90% Hydroperoxyd, der Rest bestand aus dem korrespondierenden Alkohol. Außerdem waren zu 1% auch Verunreinigungen in Form von Acetophenon und 2-methyl-Styren im Cumolhydroperoxyd enthalten. Die wässrigen Stammlösungen wurden täglich frisch bereitet. Tests ergaben, daß die Hydroperoxydkonzentrationen für mindestens 24 h konstant blieben. 3-Amino-1,2,4-triazol wurde von Fluka (Buchs) bezogen. Morpholinopropansulfonsäure kam von Serva (Heidelberg). Die anderen Chemikalien waren von Merck (Darmstadt), die Biochemikalien von Boehringer (Mannheim).

3. Ergebnisse

3.1 Oxidation von Cytochrom b_5 durch Hydroperoxyde in isolierten Hepatozyten

Das Differenzspektrum der Soret-Bande von isolierten Hepatozyten zwischen dem Zustand in Anwesenheit von 0.7 mM tert-Butyl-Hydroperoxyd und dem Zustand ohne dieses Peroxyd wird durch ein einzelnes Minimum in der Nähe von 425 nm charakterisiert, das dem Differenzspektrum oxidiert minus reduziert von isoliertem Cytochrom b_5 entspricht (Abb.1a).

Entsprechend zeigt auch das Differenzspektrum der alpha-Bande ein Minimum bei 556 nm (Abb.1b).

Die durch die Zugabe von tert-Butyl-Hydroperoxyd in den Versuchen ausgelöste Spektraländerung kann also hauptsächlich auf Cytochrom b_5 zurückgeführt werden.

Der Effekt des Hydroperoxyds kann mit dem eines anderen Elektronenakzeptors verglichen werden, mit Ferricyanid.

Die Zwei-Wellenlängenaufzeichnung (Abb.2) zeigt, daß die mit den beiden Substanzen erhaltenen Effekte nicht

additiv sind. In Abb.2a wird zunächst zu isolierten

Hepatozyten Ferricyanid und danach tert-Butyl-Hydroperoxyd

zugegeben, für den Versuch in Abb.2b wurde umgekehrt ver-

fahren. Im zweiten Fall zeigt sich, daß die Spektral-

änderungen, die durch das Hydroperoxyd hervorgerufen

werden, nur vorübergehend bestehen bleiben. Die maximale

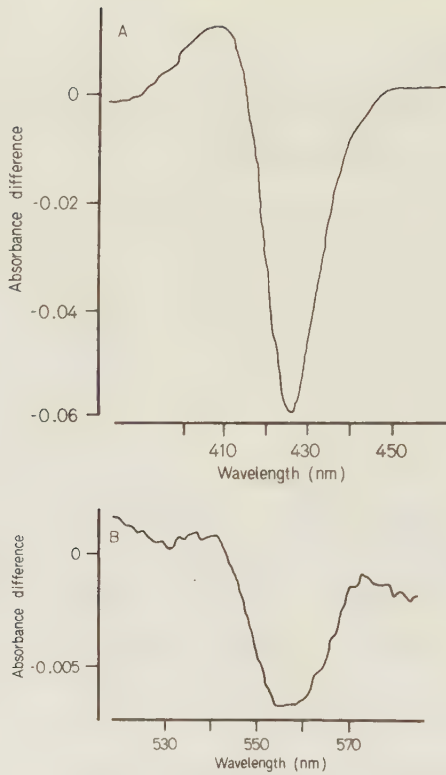


Abb.1

Absorptionsdifferenzspektren von isolierten Hepatozyten aus Rattenleber. Die Spektren entsprechen dem stat. Zustand nach Zugabe von tert-Butylhydroperoxyd minus dem stationären Zustand vor dieser Zugabe. Inkubationsbedingung I, ca. 5mg Hepatozytenprotein / ml. A und B stammen von verschiedenen Inkubationen.

Oxidation des Cytochroms b_5 dauert für etwa 1 min an, dann geht das Cytochrom wieder in einen reduzierten Zustand über. Daraus kann auf eine während dieser Zeit erfolgende Reduktion des Hydroperoxyds zu dem korrespondierenden Alkohol geschlossen werden. Da das organische Hydroperoxyd vor allem durch die mit der Glutathion-Reduktase gekoppelten Glutathion-Peroxidase reduziert wird, sollte sich dieser Zeitablauf der Reaktion auch im Verhalten des Redoxstatus des NADPH widerspiegeln (15,21,22). Das wird durch die Abb.3a,b belegt. Hier wird der Verlauf der Oxidation von Cytochrom b_5 mit dem der Nikotinamidnukleotide verglichen, wobei letztere vor allem durch die Oxidation von NADPH repräsentiert wird (15,22). Bei Zugabe des korrespondierenden Alkohols, tert-Butanol, wurde keine Spektraländerung beobachtet.

Die Zugabe von Wasserstoffperoxyd zu Hepatozyten führt zu Effekten, die man mit den mit tert-Butyl-Hydroperoxyd erreichten vergleichen kann. Da aber auch Katalase in den Zellen anwesend war, war es schwieriger mit H_2O_2 einen stationären Zustand zu erreichen (Abb.4).

Die mit den beiden Peroxyden erhaltenen Effekte kann man am besten vergleichen, wenn man nach der Zugabe von Wasserstoffperoxyd den damit erzielten Effekt in Beziehung zu dem mit tert-Butyl-Hydroperoxyd weiter erreichten Effekt setzt (Abb.4).

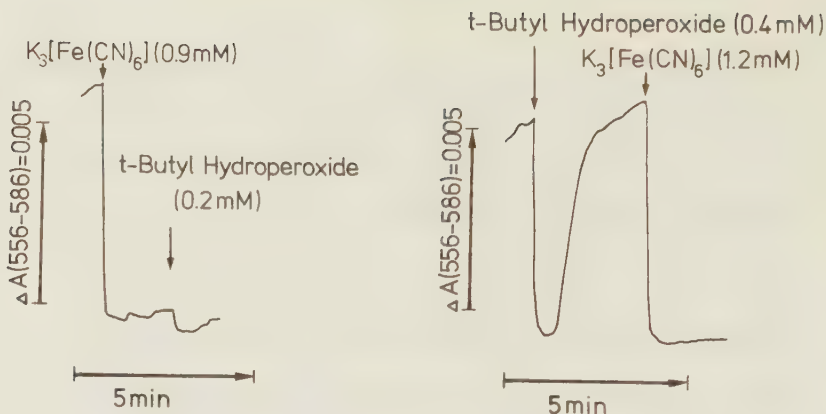


Abb. 2

Zwei-Wellenlängenregistrierung von $\Delta A_{556-586}$ von isolierten Rattenleber-Hepatozyten. Inkubationsbedingung II.

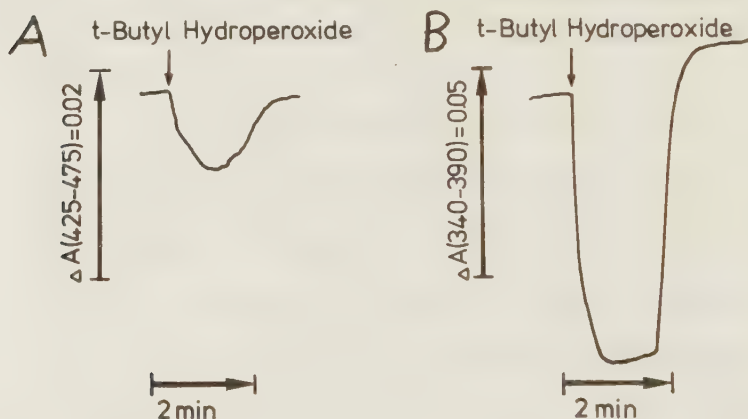


Abb. 3

Zwei-Wellenlängenregistrierung von Cytochrom b_5 (A) und NADPH (B). Registrierung des Effekts von tert-Butyl-Hydroperoxyd (0.5 mM) auf isolierte Rattenleber-Hepatozyten. Inkubationsbedingung II.

Bei der Generierung von Wasserstoffperoxyd innerhalb der Zellen durch Zugabe von Glykolat kann man eine Erhöhung des stationären Redoxzustandes von Katalase $\text{Fe}^{3+}-\text{H}_2\text{O}_2$ beobachten (23). Die zusätzliche Bildung von H_2O_2 in den Zellen läßt sich auf etwa 450 nMol/min/g Leber berechnen (24). Von besonderem Interesse ist es, daß in Anwesenheit von Glykolat eine leichte Oxidation von Cytochrom b_5 zu beobachten ist. Dieser Effekt ist allerdings relativ klein, in einigen Versuchen war er nur schwer von den Verhältnissen in den Kontrollversuchen abzugrenzen. Um einen möglichen Effekt des endogen erzeugten Wasserstoffperoxyds auf den Redoxzustand des Cytochrom b_5 besser zu demonstrieren, wurden Ratten eine Stunde vor den Experimenten mit 3-amino-1,2,4-triazol vorbehandelt. Diese Vorbehandlung führt zu einer Modifikation der intrazellulären Katalase, dabei werden mehr als 95% der Katalase inaktiviert (25,26). Wie Abb.5a zeigt, erhält man mit den Hepatozyten aus der Leber von mit 3-amino-1,2,4-triazol vorbehandelten Ratten bei der Zugabe von Glykolat ähnliche Spektraländerungen wie bei der Zugabe organischer Hydroperoxyde. Abb.5b zeigt, daß man einen Effekt erzielen kann, der dem in Abb.1a vergleichbar ist, wenn man nach der Zugabe von Glykolat noch Cumolhydroperoxyd zugibt. Das mit Glykolat erhaltene Differenzspektrum zeigt, daß der Redoxzustand des Cytochrom b_5

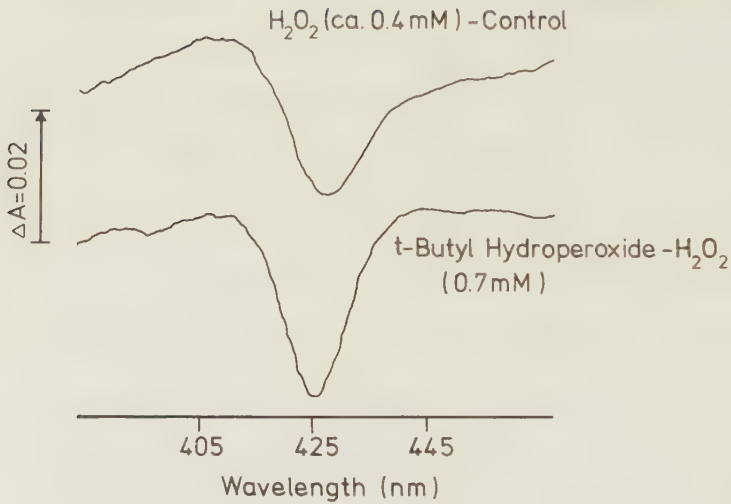


Abb.4

Effekt von H_2O_2 auf das Absorptionsdifferenzspektrum isolierter Rattenleber-Hepatozyten.

Das obere Spektrum zeigt den Zustand nach Zugabe von etwa 0.4 mM H_2O_2 minus den stationären Zustand vor der Zugabe. Inkubationsbedingung I (Die H_2O_2 -Konzentration wurde anhand des Anstiegs der Sauerstoffkonzentration beurteilt.)

Das untere Spektrum zeigt den weiteren Verlauf des Experiments nach Zugabe von tert-Butylhydroperoxyd.

durch endogen erzeugtes Wasserstoffperoxyd verändert werden kann.

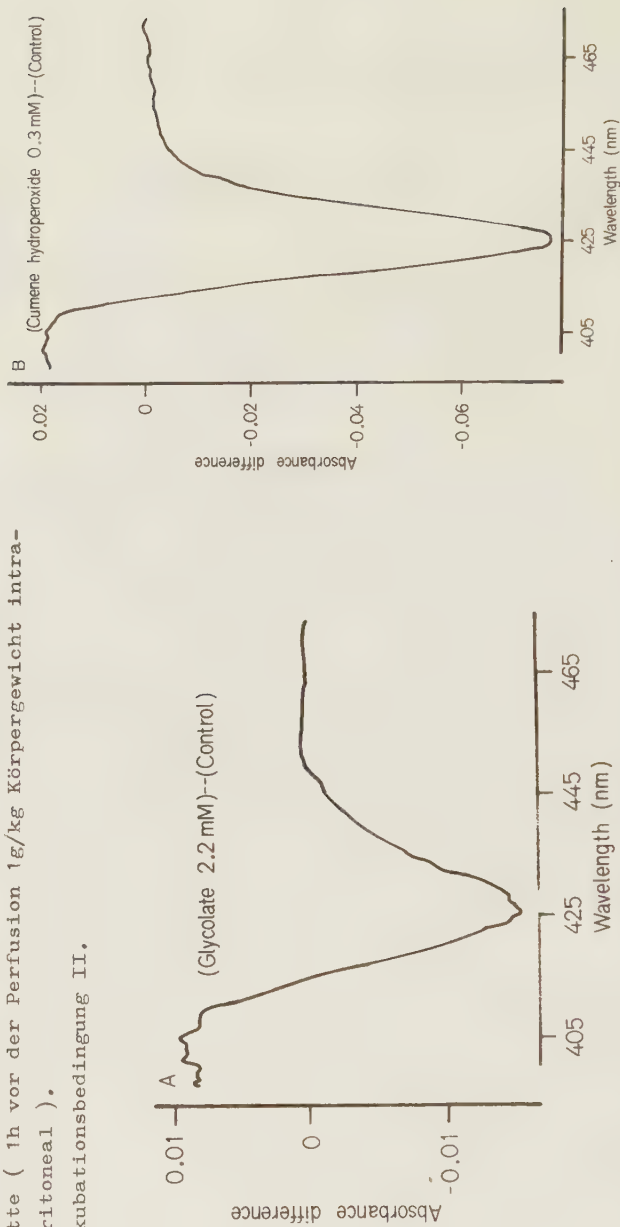
2.2 Oxidation von Cytochrom b_5 in perfundierter Rattenleber

In hämoglobinfrei perfundierter Rattenleber führt die Zugabe von tert-Butyl-Hydroperoxyd zum Perfusat zu Änderungen im Spektrum, die einer Oxidation von Cytochrom b_5 zugeschrieben werden können (Abb.6b). Allerdings stellt sich das Minimum bei 556 nm dabei etwas verbreitert dar im Vergleich zu den mit isolierten Hepatozyten erhaltenen Ergebnissen (Abb.1b), eine Beteiligung anderer Cytochrome, z.B. von Cytochrom b, bei diesem Übergang ist nicht ausgeschlossen. Zum Vergleich zeigt Abb.6a das Differenzspektrum der perfundierten Rattenleber bei Anoxie. Eine Änderung in der alpha-Bande der Cytochromoxidase konnte mit tert-Butyl-Hydroperoxyd nicht festgestellt werden.

Abb. 5

Hepatozyten einer mit 3-amino-1,2,4-triazol vorbehandelten Ratte (1h vor der Perfusion 1g/kg Körpergewicht intraperitoneal).

Inkubationsbedingung II.



Das Referenzspektrum für A und B wurde bei einer O_2 -Konzentration von 0.6 mM aufgenommen. Glykolat wurde dann bei einer $[O_2]$ von 0.4 mM zugegeben. Das Differenzspektrum A wurde bei einer $[O_2]$ von 0.2 mM aufgenommen und danach Cumolhydroperoxyd zugegeben. Das Differenzspektrum B wurde dann bei einer $[O_2]$ von 0.1 mM geschrieben.

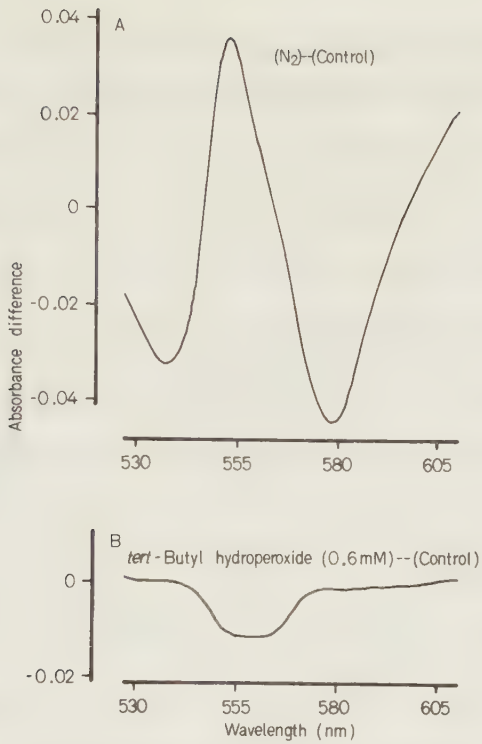


Abb.6

Differenzspektrum perfundierter Rattenleber

A: Anoxie minus endogenem stationärem Redoxzustand.

B: Zustand nach 3 min Infusion von tert-Butylhydroperoxyd minus endogenem stationärem Redoxzustand.

3.3 Oxidation von Cytochrom b_5 durch Hydroperoxyde und ihre Beziehung zur Atmungskette der Mitochondrien

Wenn man isolierte Hepatozyten mit Antimycin A versetzt, erhält man ein Differenzspektrum, das eine Reduktion von Cytochrom b und eine Oxidation von Cytochrom c zeigt (Abb.7a). Es ist bemerkenswert, daß dabei keinerlei erkennbare Oxidation der Cytochromoxidase auftritt, das weist darauf hin, daß dieses Cytochrom im endogenen stationären Redoxzustand weitgehend oxidiert vorliegt. Das stimmt zwar mit den Beobachtungen an perfundierter Rattenleber (27) überein, weicht aber von den Ergebnissen, die Wilson und Mitarbeiter (28) mit isolierten Hepatozyten erhielten, ab.

Benutzt man das unter Antimycin A erhaltene Spektrum als Referenzspektrum, so erhält man durch die anschließende Zugabe von tert-Butylhydroperoxyd ein Differenzspektrum (Abb.7b), das wiederum das Spektrum von Cytochrom b_5 zeigt. Daraus kann man schliessen, daß Cytochrom b_5 , zumindest für die in diesen Experimenten verfolgte Zeit (ca.5 min), auch in Anwesenheit von Antimycin A reduziert geblieben ist. Ausserdem weist dieses Experiment darauf hin, daß spektrale Änderungen durch andere Cytochrome als Cytochrom b_5 die Beobachtung des Hydroperoxydeffekts nur in vernachlässigbarer Weise beeinflussen dürften.

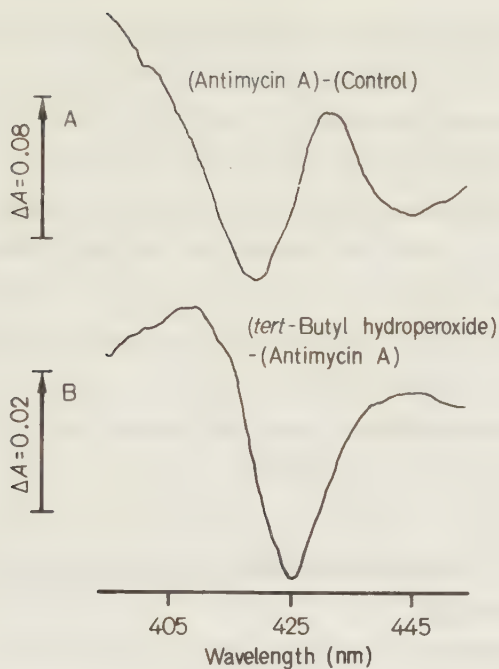


Abb.7

Absorptionsdifferenzspektren von isolierten Hepatozyten
Inkubationsbedingung I

A: Stationärer Zustand nach Zugabe von Antimycin A
(40 nmol/ml) minus endogenem stationären Zustand

B: Differenzspektrum nach anschließender Zugabe von
0.5 mM tert-Butylhydroperoxyd minus dem Zustand
unter Antimycin A

Die Oxidation von Cytochrom b_5 durch H_2O_2 nach Gabe von Antimycin A konnte ebenfalls beobachtet werden.

Eine Oxidation des Cytochroms b_5 von isolierten Mitochondrien war schwer nachzuweisen, da in den Außenmembranen der Mitochondrien vergleichsweise wenig Cytochrom b_5 enthalten ist. In von Mitochondrien in ADP - kontrolliertem Zustand (state 4) erhaltenen Spektren wurde nach Zugabe von tert-Butyl-Hydroperoxyd eine kleine Einsenkung bei 430 nm beobachtet. Das könnte auf eine Beteiligung von Cytochrom b hinweisen, dieser Effekt wurde aber nicht weiter verfolgt.

3.4 Cytochrom P-450 und der Effekt von Hydroperoxyden auf Cytochrom b_5

Um eine mögliche Beteiligung des Cytochroms P-450 bei den Reduktions-Oxidations-Übergängen des Cytochroms b_5 zu erfassen wurden Experimente mit phenobarbitalvorbehandelten Ratten durchgeführt. Die Tiere 1 mg Phenobarbital / ml Trinkwasser über mindestens 7 Tage (29a). Differenzspektren unter den Bedingungen wie in Abb.1 zeigten keine Unterschiede zwischen den Hepatozyten vorbehandelter und unvorbehandelter Ratten. Abb.8a zeigt, daßwährend des stationären Zustandes der Hexobarbitaloxidation in Hepatozyten von mit Phenobarbital vorbehandelten Ratten ein sog. Typ-I-Bindungsdifferenzspektrum zu

beobachten ist. Dieses Spektrum wird durch ein Maximum bei 390 nm (nicht abgebildet) und ein Minimum bei 420 nm charakterisiert, wie dies an intakten Systemen in perfundierter Rattenleber und in Hepatozyten schon demonstriert wurde (29,30). Wenn das unter Hexobarbital gemessene Spektrum als Referenzspektrum benutzt wird, so erhält man mit dem nach der Zugabe von tert-Butylhydroperoxyd gemessenen Spektrum ein Differenzspektrum, welches wiederum das Spektrum von Cytochrom b_5 darstellt. Dieses Differenzspektrum (tert-Butylhydroperoxyd minus Hexobarbital) ist in Abb.8b wiedergegeben. In den längeren Wellenlängenbereichen findet sich dabei eine etwas verminderte Absorption, dieses Ergebnis war allerdings nicht konstant zu beobachten, unter Cumolhydroperoxyd trat es nicht auf; eine Beteiligung von Cytochrom P-450 kann aus diesen Spektren nicht abgeleitet werden. Dieses Ergebnis wird auch durch Abb.9 erhärtet. Bei dem hier dargestellten Versuch wurde Kohlenmonoxyd in Indikator-mengen (siehe 2.4 Methoden) in die Küvetten eingebracht und anschliessend der Hydroperoxydeffekt beobachtet. Hierbei zeigte sich kein Effekt, der dem Cytochrom P-450 zugeschrieben werden könnte. Im Experiment von Abb.9 lag der stationäre Redoxzustand des Cytochroms P-450 bei 30% in A und B, wie nachfolgende Messungen mit Dithionit ergaben.

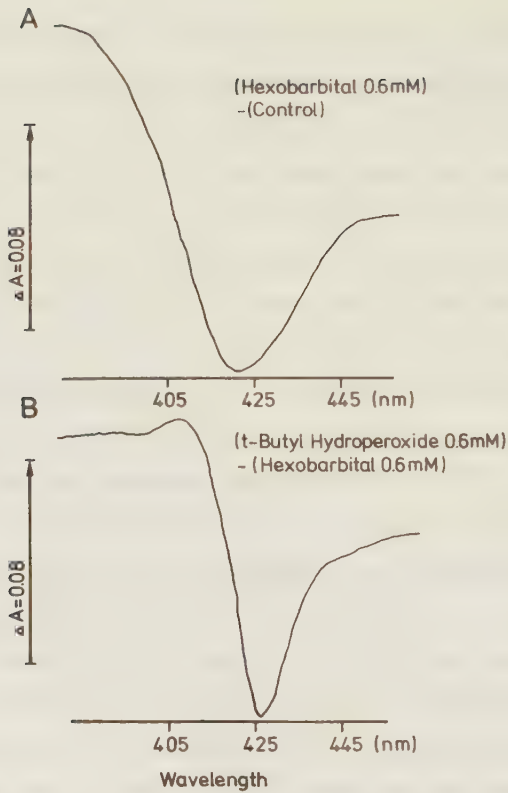


Abb.8

Absorptionsdifferenzspektren von Hepatozyten einer mit Phenobarbital vorbehandelten Ratte.

Inkubationsbedingung I

A: Zustand unter Hexobarbital minus endogenem stationären Zustand;

B: Spektrum nach anschliessender Zugabe von tert-Butylhydroperoxyd minus dem Spektrum unter Hexobarbital.

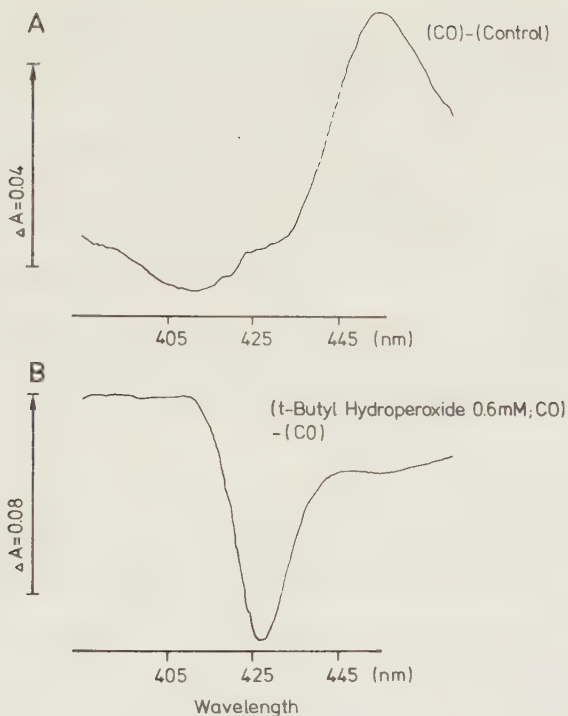


Abb.9

Absorptionsdifferenzspektren von Hepatozyten einer mit Phenobarbital vorbehandelten Ratte.

Inkubationsbedingung I

A: Zustand in Anwesenheit von Kohlenmonoxyd minus endogenem stationären Zustand.

B: Zustand nach anschliessender Zugabe von tert-Butylhydroperoxyd minus dem in Gegenwart von Kohlenmonoxyd.

Wenn Hepatozyten von mit Phenobarbital vorbehandelten Ratten mit Hydroperoxyd versehen wurden und dann nach Reduktion mit Dithionit mit Kohlenmonoxyd versetzt wurden, zeigte das Differenzspektrum eine einzelne Bande bei 450 nm. Es ergab sich kein Hinweis auf eine Bildung von Cytochrom P-420 durch Hydroperoxyde. Interessanterweise zeigte sich zuerst ein Abfall der 450 nm - Bande, bevor Cytochrom b_5 oxidiert wurde, wenn das Hydroperoxyd nach Dithionit und Kohlenmonoxyd gegeben wurde, wenn also Cytochrom P-450 weitgehend als reduzierter CO - Komplex vorlag.

3.5 Oxidation von Cytochrom b_5 in isolierten Mikrosomen

Die mit den intakten Zellen erhaltenen Ergebnisse können auch an der Mikrosomenfraktion demonstriert werden. Das mit NADH reduzierte Cytochrom b_5 der Mikrosomen wird schnell oxidiert, wenn man tert-Butylhydroperoxyd zugeibt. Das Differenzspektrum (NADH reduziert minus endogen oxidiert) des Cytochroms b_5 wird invers sehr ähnlich durch das Differenzspektrum (Hydroperoxyd oxidiert minus NADH reduziert) von isolierten Mikrosomen dargestellt.

Wenn in Abwesenheit von NADH tert-Butylhydroperoxyd zu isolierten Mikrosomen zugegeben wird, sind keine Veränderungen zu beobachten.

4. Diskussion

4.1 Identifizierung der durch Hydroperoxyde hervorgerufenen Spektraländerungen als Oxidation von Cytochrom b_5

Die vorliegende Arbeit soll zeigen, daß in Anwesenheit von Hydroperoxyden in der intakten Leberzelle Änderungen im Redoxzustand von Cytochromen vor allem Cytochrom b_5 betreffen. Diese Effekte könnten bei der Untersuchung der Rolle des Cytochrom b_5 im Metabolismus eingesetzt werden. Die folgenden Beobachtungen stützen diese Möglichkeit:

1. Das Differenzspektrum, das mit tert-Butylhydroperoxyd in isolierten Leberzellen erhalten wird (Abb. 1a) entspricht dem von Cytochrom b_5 in isolierten Mikrosomenfraktionen oder dem von isoliertem Cytochrom b_5 .
2. Messungen der alpha-Bande zeigen, daß der auf Hydroperoxyde folgenden Oxidation mit Ferricyanid keine Spektraländerungen folgen.
3. In dem auf die Zugabe von tert-Butylhydroperoxyd folgenden stationären Zustand muß der Beitrag von Cytochromen aus der Atmungskette der Mitochondrien sehr gering sein, wie Spektren in Gegenwart von Antimycin A und mit isolierten Mitochondrien zeigen.

4. Cytochrom P-450, das ebenfalls in größeren Mengen im endoplasmatischen Reticulum vertreten ist, zeigte bei Zugabe von tert-Butylhydroperoxyd keine Veränderungen im Spektrum, die auf eine Rolle dieses Cytochroms beim Hydroperoxydeffekt schliessen lassen.

Der Effekt der Hydroperoxyde auf Cytochrom b_5 ist konzentrationsabhängig, Cumolhydroperoxyd und tert-Butylhydroperoxyd verhalten sich dabei verschieden. Maximale Effekte wurden mit Hepatozyten mit 0.3mM resp. 1.2mM dieser Hydroperoxyde erreicht.

Es konnte gezeigt werden (Abb.5a), daß in der Zelle mit Glykolat erzeugtes Wasserstoffperoxyd einen Effekt erzielt, der bei 23% der Oxidation liegt, die mit Cumolhydroperoxyd unter gleichen Bedingungen erreicht werden kann.

Welche Bedeutung diesem Effekt, also der Erhöhung des Redoxpotentials von Cytochrom b_5 durch endogen erzeugte Hydroperoxyde, für den Zellmetabolismus zukommt, ist noch offen.

4.2 Cytochrom b_5 und Cytochrom P-450

Die Abb. 8 und 9 zeigen, daß tert-Butylhydroperoxyd sowohl auf das Typ-I-Bindungsspektrum von Hexobarbital als auch auf den stationären Redoxzustand von Cytochrom P-450 in intakten Zellen keinen messbaren Einfluß hat.

Dieses Ergebnis kann für das Problem der Charakterisierung der Komponenten in der sogenannten NADH-Peroxidaseaktivität der Mikrosomen von Nutzen sein. Hierzu haben zum Beispiel Hrycay und O'Brien (31) unter Benutzung von Cumolhydroperoxyd Cytochrom b_5 aus dem NADH-Peroxidase-System ausgeschlossen und Cytochrom P-450 als terminale Oxidase vorgeschlagen, während Hrycay und Prough (32) Cytochrom b_5 als Glied der Kette NADH-Flavoprotein-Cyt b_5 - Cyt P-450 -Hydroperoxyd vorschlugen und wiederum Cytochrom b_5 als terminale Oxidase ausschlossen. Jansson und Schenkman (33) zeigten, daß einige NADH-abhängige Reaktionen durch Antikörper gegen die Cytochrom b_5 - Reduktase hemmbar sind, während die Stearyl-CoA-Desaturase-Aktivität nicht beeinflusst wird. Im Gegensatz zu (32) kann eine NADH-Peroxidase-Aktivität mit isoliertem Cytochrom b_5 ohne Anwesenheit von Cytochrom P-450 gezeigt werden, die Aktivität ist aber geringer als die in isolierten Mikrosomen (S.Hülsmann, B.Brauser, H.Sies, unveröffentlichte Ergebnisse). Eine Erklärung der in dieser Arbeit demonstrierten Effekte erfordert nicht eine Beteiligung des Cytochroms P-450 als obligate terminale Oxidase an der Reaktion mit Hydroperoxyden. Staudt et al. (34) zeigten in einer neueren Studie die Möglichkeit einer Funktion des Cytochroms b_5 in der Reduktion von Zwischenprodukten einer Cytochrom P-450 - Hydroperoxydreaktion.

5. Zusammenfassung

1. Cytochrom b_5 kommt als Baustein der Membranen des endoplasmatischen Reticulums in relativ großen Mengen in Leberzellen vor (1.0-1.1 nMol/mg Protein in Rattenlebermikrosomen). Im normoxischen Zustand liegt dieses Cytochrom in reduzierter Form vor; bisher liegen kaum Informationen über die funktionellen Aufgaben des Cytochrom b_5 im Metabolismus und über die Möglichkeiten der Beeinflussung seines Redoxzustandes vor.

2. Es wurden die auf die Zugabe von Hydroperoxyden folgenden Spektraländerungen bei isolierten Hepatozyten und in perfundierter Rattenleber beobachtet. Cytochrom b_5 zeigte als einziges Cytochrom unter den Versuchsbedingungen messbare Änderungen des Redoxzustandes, es wurde von Hydroperoxyden, z.B. Cumolhydroperoxyd, tert-Butylhydroperoxyd, oxidiert. Zugabe von tert-Butanol rief keine Spektraländerungen hervor, die dem Cytochrom b_5 zugeschrieben werden könnten.

3. Der Effekt ist auch dann nachweisbar, wenn die Atmungskette der Mitochondrien durch Antimycin A gehemmt ist. Mit isolierten Mitochondrien ist er nicht nachzuweisen.

4. In Anwesenheit von NADH ist eine Oxidation von Cytochrom b_5 auch in isolierten Mikrosomen durch Hydroperoxyde zu zeigen.

5. Eine Beteiligung des ebenfalls im endoplasmatischen Reticulum vorliegenden Hämoproteins Cytochrom P-450 am Hydroperoxydeffekt war nicht erkennbar. In Hepatozyten von mit Phenobarbital gefütterten Ratten konnte keine Bildung von Cytochrom P-420, keine Änderung des Reaktionsablaufs mit einem Typ-I-Substrat, Hexobarbital, sowie keine deutliche Änderung im Redoxzustand des Cytochrom P-450 gefunden werden.

Wenn Cytochrom P-450 allerdings mit Dithionit reduziert war, konnte durch anschliessende Gabe von Hydroperoxyden eine Oxidation dieses Cytochroms erzielt werden.

6. Auch die Zugabe von Wasserstoffperoxyd zu isolierter Hepatozyten führt zu einer Oxidation von Cytochrom b_5 . Experimente mit Hepatozyten von mit 3-Amino-1,2,4-triazol vorbehandelten Ratten zeigen, daß intracellulär gebildetes H_2O_2 (z.B. durch Glykolat) ebenfalls zu einer messbaren Oxidation von Cytochrom b_5 führt.

7. Der Mechanismus der zu diesen Effekten führenden Hydroperoxydreaktionen ist noch nicht geklärt. Es ist noch unklar, ob Cytochrom b_5 direkt mit den Hydroperoxyden reagiert oder nicht. Die gezeigten Effekte könnten jedoch bei der Aufklärung mit dem Cytochrom b_5 verbundener Stoffwechselwege von Nutzen sein.

6. Literaturhinweise

1. Strittmatter, C.F., Ball, E.G. (1952)
Proc. Nat. Acad. Sci. Wash. 38, 19.
2. Rogers, M.J. & Strittmatter, P. (1974)
J. Biol. Chem. 249, 895-900.
3. Klingenberg, M. (1958)
Arch. Biochem. Biophys. 75, 376-386.
4. Sottocasa, G.L., Kuylenstierna, B., Ernster, L.,
Bergstrand, L. (1967) J. Cell. Biol. 32, 415.
5. Strittmatter, P. (1968) in Biological Oxidations
(Singer, T.P. ed.) pp. 171-191,
Interscience Publications, New York.
6. Mathews, S.F., Arges, P., Levine, M. (1971) in
Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative
Biology, Vol. 36, pp. 387-395.
7. Rogers, M.J. & Strittmatter, P. (1975)
J. Biol. Chem. 250, 5713-5718.

8. Oshino, N., Imai, Y., Sato, R. (1971)
J. Biochem. 69, 155-167.
9. Oshino, N. & Sato, R. (1971)
J. Biochem. 69, 169-180.
10. Krisch, K. & Staudinger, H. J. (1961)
Biochem. Z. 334, 312-327.
- 11a. Lübbers, D. W., Kessler, M., Scholz, R. & Bücher, Th.
(1965) Biochem. Z. 341, 346-350.
- 11b. Lübbers, D. W., Scholz, R., Kessler, M. & Brauser, B.
(1964) zitiert durch Scholz, R. & Bücher, Th. (1965)
in 'Control of Energy Metabolism' (Chance, B.,
Estabrook, R. W., Williamson, J. R., eds.) pp. 393-414,
Academic Press, New York.
12. Chance, B. (1961) in 'Haematin Enzymes'
(Falk, J. E., Lemberg, R. & Morton, R. K., eds.) pp. 473-476,
Pergamon Press, Oxford, London, New York, Paris.
13. Cinti, D. L. & Schenkman, J. B. (1971)
Mol. Pharm. 8, 327-338.
- 13a. Sies, H. & Großkopf, M. (1975)
Eur. J. Biochem. 57, 513-520.

14. Berry, M.N. & Friend, D.S. (1969)
J.Cell.Biol. 43, 506-520.
15. Sies, H., Gerstenecker, C., Menzel, H. & Flohé, L. (1972)
FEBS Letters 27, 172-175.
16. Sies, H., Häussinger, D. & Grosskopf, M. (1974)
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 355, 305-318.
17. Estabrook, R.W. & Holowinsky, A. (1961)
J.Biochem.Biophys.Cytol. 9, 19-28.
18. Brauser, B. (1968) Z.Anal.Chem. 237, 8-17.
19. Niesel, W., Lübbers, D.W., Schneewolf, D., Richter, J. &
Botticher, W. (1964) Rev.Sci.Instrum. 35, 578-588.
20. Brauser, B., Bücher, Th., Sies, H. & Versmold, H. (1972)
in 'Molecular Basis of Biological Activity'
(Gaede, K., Horecker, B.L. & Whelan, W.J. eds.)
pp. 197-219, Academic Press, New York.
21. Sies, H., Gerstenecker, C., Menzel, H. & Flohé, L. (1972)
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 353, 1570.

22. Sies, H., Gerstenecker, C., Summer, K. H., Menzel, H. & Flohé, L. (1974) in 'Glutathione' (Flohé, L., Benöhr, H., Sies, H., Waller, H. & Wendel, A. eds.) pp. 261-275, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
23. Sies, H. & Chance, B. (1970) FEBS Lett. 11, 172-176.
24. Oshino, N., Chance, B., Sies, H. & Bücher, Th. (1973) Arch. Biochem. Biophys. 154, 117-131.
25. Heim, W. G., Appleman, D. & Pyfrom, H. T. (1956) Am. J. Physiol. 186, 19-23.
26. Price, V. E., Sterling, W. R., Tarantola, V. A., Hartley, R. W. & Rechcigl, M. (1962) J. Biol. Chem. 237, 3468-3475.
27. Sies, H. & Brauser, B. (1969) Hoppe-Seyler's Z. Biol. Chem. 350, 1156.
28. Wilson, D. F., Stubbs, M., Veech, R. L., Erecinska, M. & Krebs, H. A. (1974) Biochem. J. 140, 57-64.
29. Sies, H. & Brauser, B. (1970) Eur. J. Biochem. 15, 531-540.
- 29a. Marshall, W. J., and McLean, A. E. M., (1969) Biochem. Pharmacol. 18, 153.

30. Moldeus, P., Grundin, R., von Bahr, C. & Orrenius, S.
(1973) Biochem. Biophys. Res. Commun. 55, 937-944.
31. Hrycay, E.G. & O'Brien, P.J. (1974)
Arch. Biochem. Biophys. 160, 230-245.
32. Hrycay, E.G. & Prough, R.A. (1974)
Arch. Biochem. Biophys. 165, 331-339.
33. Jansson, I. & Schenkman, J.B. (1977)
Arch. Biochem. Biophys. 178, 89-107.
34. Staudt, H., Lichtenberger, F. & Ullrich, V. (1974)
Eur. J. Biochem. 46, 99-106.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Priv.Doiz.Dr.Helmut Sies, danke ich für die wertvolle Beratung und Unterstützung, sowie für seine stets aufgeschlossene Haltung mir und dieser Arbeit gegenüber, herzlich.

Für die kollegiale und freundschaftliche Atmosphäre im Labor und die gute Zusammenarbeit bei Messungen danke ich Herrn Dieter Häußinger und Herrn Karl-Heinz Summer sowie Frau Annegret Marklstorfer und Frau Ingrid Linke.

Lebenslauf

Geboren am 20.03.1949 in München als Sohn des Finanzbeamten Theodor Großkopf und dessen Ehefrau Franziska, geborene Abenthum.

Besuch der Volksschule München-Hartmannshofen 1955-1959, anschließend Besuch des Hum. Gymnasiums Burghausen bis 1964. Dann Wechsel an das Karls-Gymnasium Pasing, dort Abitur 1968.

Grundwehrdienst von 1968-1969.

Beginn des Medizinstudiums an der Ludwig-Maximilians-Universität München im Wintersemester 1969.

Ablegung der naturwissenschaftlichen Vorprüfung nach dem Sommersemester 1970.

Ablegung der ärztlichen Vorprüfung nach dem Wintersemester 1971.

Im April 1973 Beginn der Untersuchungen zur vorliegenden Dissertation bei Herrn Priv.Doiz.Dr. Sies am Institut für Physiologische Chemie, physikalische Biochemie und Zellbiologie der Universität München.

Ablegung der ärztlichen Prüfung an der Universität München am 30. Juli 1975.

Anschließend Medizinalassistentenzeit in München und Kelheim.

Approbation als Arzt am 29. Oktober 1976.

Seither Assistenzarzt am Krankenhaus Seefeld/Obb..

